

Indução de fitoalexinas em soja e em sorgo e efeito fungitóxico de extratos cítricos sobre *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*

Márcia Mikie Motoyama¹, Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada^{1*}, José Renato Stangarlin², Ana Cristina Grade Fiori-Tutida¹ e Carlos Alberto Scapim¹

¹Departamento de Agronomia, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Rua Pernambuco 1777, C. P. 91, 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência.

RESUMO. A utilização indiscriminada de agrotóxicos para o controle de doenças e de pragas de culturas tem ocasionado problemas de contaminação humana e ambiental e seleção de patógenos resistentes a esses produtos químicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de estudar o potencial de extratos cítricos (produto comercial Ecolife⁴⁰) na indução de fitoalexinas em soja e sorgo, bem como verificar sua atividade antifúngica. Foi avaliado o efeito do extrato cítrico nas concentrações de 1, 10, 100, 1.000 e 5.000 ppm sobre os fungos *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. Avaliou-se o crescimento micelial, a esporulação, a germinação de esporos e o peso seco de micélio. A indução das fitoalexinas gliceolina e deoxiantocianidina foi estudada em cotilédones de soja e mesocótilo de sorgo, respectivamente. Por meio dos resultados obtidos verificou-se que o extrato cítrico apresentou atividades antifúngica e indutora de fitoalexinas. A atividade antimicrobiana foi dose-dependente, sendo a concentração de 5.000 ppm a mais eficiente. O acúmulo de gliceolina foi maior na concentração de 5.000 ppm de extrato cítrico, enquanto que para o sorgo, houve um pico de produção de fitoalexinas na concentração de 100 ppm.

Palavras-chave: *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium semitectum*, controle alternativo, extratos cítricos.

ABSTRACT. Phytoalexin induction in soybean and sorghum and antimicrobial effect by citric extract on *Colletotrichum lagenarium* and *Fusarium semitectum*. The widespread application of agrototoxics to control crop diseases and pests has caused the human and environmental contamination problems and the selection of resistant pathogens to these chemical products. Thus, the purpose of this work was, by means of citric extracts, (Ecolife⁴⁰ commercial product), to assess the antifungal activity, as well as the induction of phytoalexins in soybean and sorghum, in order to develop an alternative method of phytopathogens control. The effect of concentrations of 1, 10, 100, 1000 and 5000 ppm of citric extract was carried out on *Colletotrichum lagenarium* and *Fusarium semitectum*. Besides, the mycelial growth and sporulation, spores germination and dry weight were evaluated. The induction of gliceollins phytoalexins in soybean cotyledons and deoxyanthocyanidins in sorghum mesocotyls was also verified. Through the results obtained, it was verified that citric extract showed antifungal and phytoalexins-inducing activities in all the essays performed. The antimicrobial activity was dosis-dependent, the most efficient being the 5000 ppm of citric extract. The gliceollin accumulation in soybean was greater for the concentration of 5000 ppm of citric extract, while for sorghum, there was a production peak in 100 ppm.

Key words: *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium semitectum*, alternative control, citric extracts.

Introdução

Há vários fatores que podem ocasionar a redução da produção em uma lavoura, dentre os quais está a ocorrência de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides. Muitos patógenos podem levar à perda total de uma cultura, causando

doenças tanto na parte aérea quanto no sistema radicular. Doenças como antracnose são ocasionadas por fungos do gênero *Colletotrichum* em várias culturas, assim como *Fusarium*, um fungo de solo, causador de doenças do tipo murcha.

O método mais utilizado para a proteção de plantas contra seus patógenos é o uso de resistência genética (Lyon *et al.*, 1995). No entanto, nem todas as plantas são resistentes a patógenos, e nem todo material resistente é adaptado a diferentes regiões. Dessa forma, o uso de agrotóxicos no controle de doenças tem sido cada vez mais freqüente na agricultura. A adoção contínua do controle químico pode acarretar o surgimento de patógenos resistentes aos produtos utilizados (Ghini e Kimati, 2000), além da contaminação de alimentos e do ambiente, intoxicação de homens e de animais, ressurgimento de algumas pragas e de outras, antes consideradas secundárias, tornando-se importantes (Burg e Mayer, 1998). Tais efeitos têm estimulado a busca por formas alternativas de controle de doenças de plantas (Nakasone *et al.*, 1999).

O controle alternativo de doenças pode ser realizado por meio do controle biológico, da indução de resistência em plantas e do uso de produtos alternativos ao controle químico, como óleos essenciais e extratos vegetais (Stangarlin *et al.*, 1999). O controle biológico é realizado pela manipulação de microrganismos antagonistas e/ou hiperparasitas (Bettiol e Ghini, 1995), enquanto a indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes nas plantas, como as fitoalexinas, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos (elicitores) (Hammerschmidt e Dann, 1997). As fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixo peso molecular sintetizados pelas plantas em resposta à infecção microbiana ou à ação de elicitores (Agrios, 1988).

Diversos produtos naturais, dentre os quais os extratos de plantas medicinais, têm mostrado a capacidade de controlar doenças em plantas, tanto por sua atividade antimicrobiana direta quanto indiretamente, por meio da indução de resistência (Stangarlin *et al.*, 1999; Fiori *et al.*, 2000b). Alguns produtos à base de extratos cítricos também apresentam esse potencial, como é o caso do Ecolife e do Kilol LDF 100. O Ecolife⁴⁰ é um produto comercial constituído por ácidos ascórbico, cítrico e láctico, flavonóides e fitoalexinas cítricas, segundo o boletim técnico Ecolife⁴⁰.

Diante do exposto, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos cítricos (produto comercial Ecolife⁴⁰) sobre os fungos *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*. Adicionalmente, verificar a capacidade desse produto em induzir fitoalexinas em cotilédones de soja e de mesocótilos de sorgo.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná. Os fungos *C. lagenarium* e *F. semitectum* foram isolados de pepino (*Cucumis sativus* L.) e de sálvia (*Salvia officinalis*), respectivamente, no Laboratório de Fitopatologia da UEM. As concentrações do extrato cítrico utilizado nos experimentos foram 0, 1, 10, 100, 1000 e 5000 ppm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 repetições em todos os experimentos realizados, exceto na determinação do peso seco dos fungos e da produção de fitoalexinas, constituídos por 3 repetições. A análise do experimento foi descritiva.

Crescimento micelial

Discos de micélio de 8 e 6mm de diâmetro de culturas com 7 e 13 dias de idade de *C. lagenarium* e de *F. semitectum*, respectivamente, foram transferidos para a superfície de placas de Petri, contendo extrato cítrico (Ecolife⁴⁰) nas diferentes concentrações, incorporado ao BDA. As placas foram incubadas a 24°C e mantidas sob luz constante. A avaliação foi realizada no momento em que o crescimento da testemunha atingiu 2/3 da placa de Petri, determinando-se a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) dos tratamentos em relação à testemunha.

Para a realização da contagem dos esporos, 1ml de água destilada estéril foi adicionado em cada placa contendo os diferentes fungos. A colônia foi levemente raspada, de modo a se obter uma suspensão, e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico.

Germinação de esporos e formação de apressórios

Em placas de Elisa foram colocados 40µl das concentrações do extrato cítrico e 40µl de uma suspensão 1×10^5 esporos/mL de *C. lagenarium* e de *F. semitectum* em cada um dos recipientes (poçinhos) da placa. As placas foram incubadas sob luz constante a 24°C por 24 horas, e após esse período a germinação foi paralisada com o corante azul de algodão. Foram contados 100 esporos por repetição, totalizando 400 esporos, sendo considerados germinados os esporos que apresentaram emissão de tubo germinativo. Em *C. lagenarium* foi avaliado também o número de apressórios formados.

Determinação do peso seco

A partir de colônias de *C. lagenarium* e de *F. semitectum* com 7 dias de idade, foram retirados 3

discos de micélio (6mm de diâmetro) e colocados em erlenmeyers com 100mL de batata dextrose contendo o extrato cítrico nas diferentes concentrações. Após 7 dias de incubação sob agitação à temperatura ambiente, o material foi filtrado em papel Whatman nº40, e o micélio retido foi seco a 40-51°C até peso constante.

Bioensaio para produção de fitoalexinas em cotilédones de soja

Cotilédones de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da cultivar IAC-08 com 11 dias de idade foram destacados das plântulas, lavados e enxugados. Em cada placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água destilada estéril, foram colocados 5 cotilédones seccionados. Sobre cada cotilédone, foram aplicados 20µL de cada concentração dos extratos cítricos. Utilizou-se como testemunha água destilada estéril (controle negativo) e *Saccharomyces cerevisiae* (25mg/mL) (controle positivo). As placas foram mantidas a 25°C, no escuro, por 20 horas. Em seguida, os cotilédones foram agitados no agitador por 1 hora em 15ml de água destilada estéril. A absorbância foi determinada a 285 nm (Ayers *et al.*, 1976; Ziegler e Pontzen, 1982).

Bioensaio para produção de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) da cultivar "Brandes" foram desinfetadas em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, lavadas em água destilada e enroladas em folhas de papel de germinação umedecidas. Após incubação no escuro a 28°C por 5 dias, foram expostas à luz por 4 horas para paralisar a elongação dos mesocótilos (Yamaoka *et al.*, 1990). Os mesocótilos foram cortados acima do nó escutelar e em cada microtubo (Eppendorf), contendo 1mL das concentrações dos extratos cítricos, foram colocados 3 mesocótilos. Os controles usados foram água e *S. cerevisiae*. Os tubos foram mantidos em câmara úmida, a 25°C, sob luz, por 60 horas. Em seguida, os mesocótilos foram retirados dos tubos, pesados, cortados em 3 segmentos e colocados em outros tubos contendo 1,4ml de metanol 80% acidificado (0,1% HCL; v/v). Esses mesocótilos foram mantidos a 4°C no metanol por 96 horas, para extração dos pigmentos. A absorbância foi determinada a 480nm.

Resultados e discussão

Efeito do extrato cítrico no crescimento micelial e esporulação de *C. lagenarium* e de *F. semitectum*

Os resultados obtidos para *C. lagenarium* podem ser vistos na Tabela 1. Os dados permitem observar

que o fungo foi sensível ao tratamento com extrato cítrico, porém, em 10 ppm, houve uma menor inibição do *C. lagenarium* comparado à inibição apresentada em 1 ppm. Nas demais concentrações, houve uma inibição crescente do fungo, chegando a 70,45% de inibição em 5.000 ppm de extrato cítrico. Com base nos resultados obtidos na inibição do crescimento micelial e na esporulação de *C. lagenarium* (Tabela 2), é possível verificar que há uma relação entre esses dois dados. Nota-se que onde houve uma maior inibição do crescimento micelial, houve uma menor concentração de esporos produzidos. Da mesma forma, onde houve uma menor inibição, houve uma maior esporulação. De acordo com Ecolife (s.d), os ácidos orgânicos (ascórbico, cítrico e láctico) e os bioflavonóides conferem ao Ecolife⁴⁰ uma ação antioxidante e, juntamente com os peptídeos, atuam como microbiostáticos, auxiliando no equilíbrio da flora microbiana vegetal.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de extrato cítrico no crescimento micelial e no peso seco, *in vitro*, de *Colletotrichum lagenarium* e de *Fusarium semitectum*

Extrato cítrico (ppm)	Inibição do crescimento radial do micélio (%)		Peso seco do micélio (g)	
	<i>C. lagenarium</i>	<i>F. semitectum</i>	<i>C. lagenarium</i>	<i>F. semitectum</i>
Controle ¹	0	0	0,54	0,62
1	12,91	-3,69	0,57	0,61
10	1,11	-0,58	0,57	0,59
100	23,64	3,26	0,54	0,60
1000	48,21	4,41	0,39	0,38
5000	70,45	48,80	0,37	0,37

¹Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose sólido ou líquido para crescimento radial e para peso seco, respectivamente

Tabela 2. Efeito *in vitro* do extrato cítrico na esporulação, germinação de esporos e formação de apressórios em *C. lagenarium* e *F. semitectum*

Extrato cítrico (ppm)	<i>Colletotrichum lagenarium</i>			<i>Fusarium semitectum</i>	
	Número de esporos (10 ⁶ /ml)	Germinação de esporos (%)	Formação de apressórios (%)	Número de esporos (10 ⁷ /ml)	Germinação de esporos (%)
Controle ¹	29,98	83,93	56,25	1,96	98,00
1	15,25	56,17	42,67	4,43	91,50
10	27,46	52,08	41,92	3,19	85,50
100	6,70	34,00	12,84	2,48	1,00
1000	8,05	1,00	0,22	1,22	0,25
5000	1,59	0,0	0,0	2,11	0,0

¹Controle representado pelo crescimento fúngico em meio batata-dextrose-água sem adição de extrato cítrico

Sobre o crescimento micelial de *F. semitectum* (Tabela 1), observou-se que nas concentrações de 1 e 10 ppm houve estímulo de 3,69 e 0,58%, respectivamente, no crescimento das colônias em relação à testemunha. A partir de 100 ppm, houve inibição do crescimento micelial, atingindo um máximo de 48,18% em 5.000 ppm. Quanto ao número de esporos produzidos, observa-se uma

pequena inibição (1,22%) quando utilizado Ecolife⁴⁰ na concentração de 1000 ppm. Resultados semelhantes foram observados para *F. semitectum*. Em relação à esporulação (Tabela 2), verificou-se que houve inibição da produção de esporos à medida que se aumentou a concentração do extrato cítrico. Em 10 ppm, houve uma maior esporulação comparada à concentração de 1 ppm. Apesar disso, esta permaneceu menor do que a da testemunha. Esse comportamento também pode ser observado em 1.000 ppm, cuja esporulação foi maior que na concentração de 100 ppm.

Experimentos realizados por Fiori et al. (2000b) avaliaram a atividade de lectinas isoladas de várias plantas na germinação de esporos e indução de fitoalexinas. Os autores observaram que as lectinas de *Dioclea violacea* foram mais eficientes em inibir a germinação de esporos de *Fusarium* sp., *Puccinia* sp. *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum lagenarium*. As lectinas de *Cratylia floribunda* proporcionaram maior inibição de *C. lagenarium*.

Vários trabalhos com extratos vegetais já foram realizados com o objetivo de controlar fitopatógenos. Verifica-se, de maneira geral, que houve uma tendência de que quanto maior a concentração, maior o efeito do extrato no sentido de inibir o crescimento micelial do fungo. Isso está de acordo com o trabalho feito por Fortes et al. (1997), que testaram o efeito de Lonlife (produto à base de extratos cítricos) sobre o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani*. Todos os fungos foram sensíveis à menor concentração testada, havendo redução significativa no diâmetro das colônias com o aumento das concentrações de Lonlife.

Adicionalmente, Fortes et al. (1999) realizaram um experimento em que avaliaram o efeito de Ecolife e *Allium sativum* nas concentrações de 500, 1.000, 5.000 e 10.000 ppm sobre o desenvolvimento de *C. lindemuthianum* e de *Fusarium oxysporum*. Os resultados mostraram que o Ecolife na concentração de 10.000 ppm inibiu o crescimento micelial de *C. lindemuthianum* em 74% e de *F. oxysporum* em 56,06%.

Extrato aquoso de folhas de *Azadirachta indica*, *Chromolaena odorata*, *Lantana camara*, *Piper colbrinn* e *Strychnos nuxvomica* foram testados sobre as fases vegetativa e reprodutiva de *Phytophthora capsici*. Os resultados indicaram que o crescimento micelial, a produção de esporângio e zoósporos e a liberação e a germinação de zoósporos foram completamente inibidos por extratos de *C. odorata* a 2%. Os demais extratos também inibiram o desenvolvimento do

patógeno, mas não com a mesma efetividade (Anandaraj e Leela, 1996).

Fiori et al. (2000a) avaliaram o efeito de extratos e de óleos de algumas plantas medicinais contra *Didymella bryoniae*. Foi observado que o extrato bruto de *Eucalyptus citriodora* e *Ageratum conyzoides* foram os mais efetivos na inibição do crescimento micelial de *D. bryoniae*, e que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, de *Ageratum conyzoides* e de *Eucalyptus citriodora* inibiram 100% do crescimento micelial e da germinação de esporos do fungo.

Efeito do extrato cítrico no peso seco do micélio de *C. lagenarium* e *F. semitectum*

O peso seco do micélio de *C. lagenarium* e *F. semitectum* pode ser visualizado na Tabela 1. Nota-se que houve um pequeno estímulo no crescimento micelial constatado pelo maior peso de micélio de *C. lagenarium* nas concentrações de 1, 10 e 100 ppm, sendo este último igual à testemunha. Já em 1.000 e 5.000 ppm, houve inibição do crescimento, e, conseqüentemente, um menor peso seco de micélio.

Para *F. semitectum*, nas concentrações de 1 a 100 ppm, a diferença de crescimento foi mínima em relação à testemunha. Em 1.000 e 5.000 ppm quase não houve crescimento, sendo observado praticamente o disco de micélio nos frascos.

Singh et al. (1979) avaliaram o efeito de extrato de folha de alho (*A. sativum*) em *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* e em *Sclerotinia sclerotiorum* e observaram que o extrato, nas concentrações de 7.000 e 5.000 ppm, respectivamente, reduziu o crescimento desses fungos em meio líquido.

Krämer et al. (1984) avaliaram a atividade de isoflavonas de soja e de grão-de-bico em *Aspergillus ochraceus*, em *Penicillium digitatum* e em *Fusarium culmorum*. Os resultados mostraram que isoflavonas e isoflavanonas são variáveis na atividade. Enquanto o crescimento de *A. ochraceus* é inibido significativamente por alguns isoflavonóides, *P. digitatum* e *F. culmorum* são inibidos, bem como estimulados em seu crescimento, dependendo da substância e da concentração aplicada.

Efeito do extrato cítrico na germinação de esporos de *C. lagenarium* e de *F. semitectum*

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados da germinação de esporos e da formação de apressórios de *C. lagenarium* e da germinação de esporos de *F. semitectum*.

Os resultados permitem observar que houve inibição da germinação dos esporos de *C. lagenarium* diante do aumento das concentrações de extrato cítrico, atingindo 100% de inibição na concentração

de 5.000 ppm. O mesmo comportamento pôde ser observado na formação de apressórios.

Singh *et al.* (1990) verificaram que a germinação de esporos dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium udum* e *Colletotrichum* sp. foi completamente inibida por ajoene a 25µg/ml. Entretanto, para *Fusarium lini* e *Alternaria trititina*, a inibição da germinação ocorreu quando o ajoene foi utilizado na concentração de 100µg/ml.

Franco e Bettiol (2000) avaliaram o efeito dos produtos alternativos Lonlife, ácidos ascórbico, bórico, cítrico, glutâmico, acetilsalicílico, tartárico e málico, bicarbonato e carbonato de sódio e de potássio, metabissulfito de sódio e de potássio, sorbato de potássio, vinagre, benzoato de sódio, lecitina e thiabendazole sobre a inibição da germinação de esporos de *Penicillium digitatum*. Observaram que a percentagem de inibição da germinação de conídios com ácido glutâmico, thiabendazole, ácido ascórbico, cítrico, bicarbonato e carbonato de sódio foram de 11%, 18%, 80%, 91%, 95% e 96%, respectivamente.

Efeito do extrato cítrico na produção de fitoalexinas glicécolinas e de deoxiantocianidinas

Por meio dos resultados obtidos no ensaio de fitoalexinas (Tabela 3), pôde-se verificar que houve produção de fitoalexinas glicécolinas e de deoxiantocianidinas em todas as concentrações testadas. Em 10 ppm, houve um acúmulo menor em relação a 1 ppm, mas, nas demais concentrações, o acúmulo foi maior, acompanhando o aumento das concentrações do extrato cítrico, para glicécolina.

Tabela 3. Produção das fitoalexinas glicécolina em cotilédones de soja e deoxiantocianidina em mesocótilo de sorgo tratados com diferentes concentrações de extrato cítrico

Tratamentos	Glicécolina (ABS ₂₈₅) ¹	Deoxiantocianidina (ABS ₄₈₀ /g.p.f.) ²
Extrato cítrico (ppm)		
1	0,39	0,62
10	0,30	11,78
100	0,40	21,34
1000	0,45	11,94
5000	0,86	9,42
Água ³	0,12	3,53
<i>S. cerevisiae</i> ⁴	0,28	9,07

¹ Absorbância determinada em 285 nm; ² Absorbância determinada em 480 nm por grama de peso fresco (g.p.f.); ³ Controle negativo: água destilada esterilizada; ⁴ Controle positivo: *Saccharomyces cerevisiae* (25 mg do produto comercial/ml)

Na Tabela 3, os resultados indicam que houve acúmulo de deoxiantocianidina em todas as concentrações testadas de extrato cítrico. Em 1 ppm, houve menor produção de fitoalexina em relação à testemunha positiva, mas foi maior do que a testemunha negativa. Houve um pico de acúmulo

em 100 ppm chegando este a induzir duas vezes mais fitoalexinas do que a testemunha positiva.

Da mesma forma, Vigo *et al.* (2001) avaliaram a produção de glicécolinas e a inibição da germinação de esporos de *Microspora diffusa* pela tintura vegetal de *Pfaffia glomerata* (0.1%, 1%, 5%, 10%, 20% e 25%) e observaram que a tintura de *P. glomerata* a 10% chegou a induzir duas vezes mais glicécolina do que a testemunha positiva.

Extratos aquosos de eucalipto autoclavado e não-autoclavado induziram à síntese de fitoalexinas em sorgo a partir de 1%. Em soja, ocorreu a indução da síntese a partir de 10 e de 15%, em extratos autoclavados e não-autoclavados, respectivamente (Bonaldo, 2001).

Nas condições desses experimentos, pôde-se concluir que:

- o extrato cítrico apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra os fungos *Colletotrichum lagenarium* e *Fusarium semitectum*;
- o extrato cítrico apresentou atividade elicitora, induzindo a síntese das fitoalexinas glicécolina em cotilédones de soja e deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

Referências

- AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. San Diego: Academic Press, 1988.
- ANANDARAJ, M.; LEELA, N.K. Toxic effect of some plant extracts on *Phytophthora capsici*, the root rot pathogen of black pepper. *Indian Phytopathol.*, New Delhi, v. 49, n. 2, p. 181-184, 1996.
- AYERS, A.R. *et al* Host-pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.*, Bethesda, v. 57, p. 751-759, 1976.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: BERGAMIN FILHO, A. *et al.* (Ed.). *Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos*. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p.717-718.
- BONALDO, S.M. *Fungitoxicidade, indução de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em pepino a Colletotrichum lagenarium, pelo extrato aquoso de Eucalyptus citriodora (eucalipto)*. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2001.
- BURG, I.C.; MAYER, P.H. Introdução. In: BURG, I.C.; MAYER, P.H. (Ed.). *Manual de alternativas ecológicas para prevenção e controle de pragas e doenças*. Francisco Beltrão: Grafite, 1998. p.13.
- ECOLIFE. [S.l., s.d.]. Disponível em: <http://www.naturalrural.com.br>. Acesso em: 29 de outubro de 2003.

- FIORI, A.C.G. et al. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *J. Phytopathol.*, Berlin, v. 148, p. 483-487, 2000a.
- FIORI, A.C.G. et al. Atividade de lectinas sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 25p. 373, 2000b. Resumo n.266.
- FORTES, N.L.P. et al. O efeito do Lonlife sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 22, p. 264, 1997. (Resumo n.187).
- FORTES, N.L.P. et al. Ação de extratos vegetais no controle *in vitro* de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 24, p. 308, 1999. (Resumo n.376).
- FRANCO, D.A.S.; BETTIOL, W. Controle de *Penicillium digitatum* em pós-colheita de citros com produtos alternativos. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 25, n. 4, p. 602-605, 2000.
- GHINI, R.; KIMATI, H. *Resistência de fungos a fungicidas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E. K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). *Environmentally safe approaches to crop disease Control*. Boca Raton: CRC - Lewis Publishers, 1997, p.177-199.
- KRÄMER, R.P. et al. Antifungal activity of soybean and chickpea isoflavones and their reduced derivatives. *Phytochemistry*, Oxford, v. 23, n. 10, p. 2203-2205, 1984.
- LYON, G. D. et al. Novel disease control compounds: the potential to "immunize" plants against infection. *Plant Pathol.*, Oxford, v. 44, p. 407-427, 1995.
- NAKASONE, A.K. et al. Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. *Summa Phytopathol.*, Jaboticabal, v. 25, n. 4, p. 331, 1999.
- SINGH, U.P. et al. Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). *Can. J. Bot.*, Ottawa, v. 68, p. 1354-1356, 1990.
- SINGH, U.P. et al. Effect of leaf extract of garlic on *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*, *Sclerotinia sclerotiorum* and on gram seeds. *Mycologia*, Lawrence, v. 71, p. 556-563, 1979.
- STANGARLIN, J.R. et al. Plantas medicinais. *Biotechnol.: Cienc. Desenvolv.*, Brasília, n. 11, p. 16-21, 1999.
- VIGO, S.C. et al. Indução de gliceolina em soja e inibição da germinação de conídios de *Microsphaera diffusa* pela tintura vegetal de *Pfaffia glomerata*. *Fitopatol. Bras.*, Brasília, v. 26, (Suplemento), p. 351, 2001. Resumo n. 311.
- YAMAOKA, N. et al. Elicitor of sorghum phytoalexin synthesis from *Colletotrichum graminicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, London, v. 37, p. 255-270, 1990.
- ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora magasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.*, London, v. 20, p. 321-331, 1982.

Received on December 17, 2002.

Accepted on October 30, 2003.